

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Développement et validation d'une nouvelle méthode d'identification par spectrométrie de masse des protéines interagissant directement ou indirectement avec une séquence oligonucléotidique

Tacheny, Aurélie

Award date:
2013

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Université de Namur,
Faculté des Sciences – Département de Biologie
Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC)
NAMur Research Institute for Life Sciences (NARILIS)

Développement et validation d'une nouvelle méthode d'identification par spectrométrie de masse des protéines interagissant directement ou indirectement avec une séquence oligonucléotidique

Dissertation originale présentée par **Aurélien Tacheney**
en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences

Composition du jury :

Professeur P. Renard (promoteur)

Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC)
NARILIS, UNamur, Namur

Professeur D. Praseuth

Régulation et dynamique des génomes
CNRS-INSERM U565, Paris

Professeur C. Pierreux

Institut de Duve (DDUV)
UCL, Woluwé-St-Lambert

Professeur B. Muylkens

Unité de Recherche Vétérinaire Intégrée (URVI)
UNamur, Namur

Professeur M. Raes

Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC)
NARILIS, UNamur, Namur

Professeur X. Debolle (président du jury)

Unité de Recherche en Biologie Moléculaire (URBM)
NARILIS, UNamur, Namur

Décembre 2013

RESUME:

L'identification des régulateurs transcriptionnels d'un gène d'intérêt représente souvent une tâche longue et délicate. En effet, la méthodologie classiquement employée afin d'identifier les protéines se liant à une séquence *cis*-régulatrice consiste à analyser au moyen de programmes bioinformatiques la présence en son sein de sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription. Ces analyses *in silico* conduisent typiquement à l'identification de plusieurs centaines de candidats, variant selon l'algorithme utilisé, parmi lesquels de nombreux faux positifs et faux négatifs. Le chercheur en est donc réduit à choisir arbitrairement quelques candidats potentiels à valider expérimentalement.

Pour cette raison, depuis plusieurs années, des stratégies basées sur le principe de chromatographie d'affinité à l'ADN sont développées afin de permettre la capture et l'identification par spectrométrie de masse des protéines interagissant avec une séquence oligonucléotidique d'intérêt. Cependant, ces méthodes, dites de « *DNA-affinity* », présentent de nombreux challenges dont la spécificité de la capture et la sensibilité de l'étape d'identification des protéines *trans*-régulatrices au sein d'un mélange protéique complexe caractérisé par une large gamme dynamique. En conséquence, ces méthodes de « *DNA-affinity* » se limitent généralement à l'analyse des protéines différenciellement capturées par une courte séquence oligonucléotidique sauvage ou mutée au niveau d'un site de liaison d'intérêt bien précis. Bien qu'intéressantes, ces approches n'en restent pas moins biaisées puisqu'elles nécessitent de poser un choix quant au site de liaison étudié.

Dans ce travail, et grâce à une combinaison inédite de stratégies expérimentales, nous avons développé une méthode efficace afin d'identifier par spectrométrie de masse, et sans aucun *a priori*, les partenaires protéiques directs ou indirects d'une séquence oligonucléotidique relativement longue. Comme validation de notre méthode, celle-ci a été appliquée à l'étude des protéines interagissant avec une séquence largement décrite dans la littérature, un fragment de 226 pb issu du promoteur viral 5'LTR du VIH-1. L'identification de membres de la famille du facteur de transcription NFκB a servi de témoin lors des nombreuses étapes de mises au point, deux sites de liaison pour ce facteur de transcription étant confirmés au sein de cette séquence. Suite aux différentes implémentations apportées à la méthode au cours de cette thèse, son application à ce fragment promoteur pourtant déjà largement étudié a permis l'identification de plus de 60 protéines potentiellement impliquées dans la transcription, dont 24 facteurs de transcription et 38 corégulateurs transcriptionnels potentiels interagissant avec la sonde de façon indirecte. L'identification de 12 facteurs de transcription préalablement connus comme interagissant de ce fragment a permis de valider l'efficacité de la méthode développée alors que l'identification de 12 autres facteurs de transcription, n'ayant jamais été décrits comme interagissant avec ce fragment, illustre bien l'intérêt de conduire des analyses sans « *a priori* ». Parmi ces interactants inédits, deux candidats, Meis et PBX-1, ont été validés par le biais de l'analyse de l'effet de la mutation de leur site de liaison potentiel sur l'activité d'un système rapporteur luciférase dépendant du 5'LTR du VIH-1. Ceci a dès lors permis la mise en évidence d'un site de liaison répresseur jusque-là non décrit au sein de ce promoteur viral. Enfin, en appliquant la méthode de « *DNA-affinity* » développée à un fragment d'ADN plus court, centré sur le site de liaison suspecté de Meis et PBX-1, sauvage ou muté, 7 membres d'un même complexe corépresseur Sin3A ont été identifiés comme partenaires spécifiques de ce site, résultat en accord avec le rôle répresseur préalablement identifié pour ce site.

ABSTRACT

Identifying transcriptional regulators of a gene of interest often represents a time- and work-consuming task, as currently used *in silico* analyses of DNA regulatory sequences are often disappointing, generating a lot of false positive and false negative candidates for further experimental validations.

For these reasons, mass spectrometry-based identification of proteins captured by DNA-affinity methods have emerged these last years. However, these methods are challenging as they have to cope with the relatively low abundance of transcriptional regulators embedded in complex mixtures of highly expressed unspecific trapped proteins. Consequently, these methods are generally conducted with short DNA sequences by comparing proteins captured by a wild-type probe to the interactions detected with a mutated binding site. Although powerful, these approaches cannot be qualified as without “*a priori*” as they require pre-existing knowledge of the binding site of interest.

In this work, we developed a straightforward procedure to detect, without “*a priori*”, a large panel of proteins interacting with a relatively long DNA sequence. As a proof of concept, a 226 bp-long sequence of the HIV-1 5’LTR promoter sequence was used as a bait, as this sequence is particularly well known and rich in transcription factor binding sites. The identification of NFκB members among the interacting proteins was first used as a read out to set up the different parameters of the technique. This approach was then used to identify more than sixty proteins related to transcription, including 24 transcription factors and 38 transcriptional coregulators that interact indirectly with the DNA sequence. The presence of several transcription factors known to regulate the transcription of HIV-1 validated the technique, while the identification of 12 other transcription factors not previously described to be involved in the context of HIV-1 regulation underlines the advantage to conduct without “*a priori*” analyses. The interaction of two of these candidates with this regulatory sequence, Meis and PBX-1, has been functionally validated by analysing the effect of the mutated binding site on a HIV-1 5’LTR-dependent luciferase reporter assay. This allowed us to highlight the presence of a yet undescribed repressor binding site. Finally, using the DNA-affinity technique on a shorter DNA fragment centered on the Meis binding site, either wild-type or mutated, we could identify 7 members of the Sin3A complex as the coregulators responsible for the transcriptional repression associated with the Meis binding site.

A Clément et Emma,

« Une vie réussie est une vie que l'on a menée conformément à ses souhaits, en agissant toujours en accord avec ses valeurs, en donnant le meilleur de soi-même dans ce que l'on fait, en restant en harmonie avec qui l'on est, et, si possible, une vie qui nous a donné l'occasion de nous dépasser, de nous consacrer à autre chose qu'à nous-mêmes et d'apporter quelque chose à l'humanité, même très humblement, même si c'est infime. Une petite plume d'oiseau confiée au vent. »

Extrait de « L'homme qui voulait être heureux » de L. Gounelle.

REMERCIEMENTS

Je pense qu'au moment présent, je ne réalise pas encore vraiment que la fin est proche... Et pourtant, me voici en train d'écrire les dernières lignes de cette thèse de doctorat et non les moindres, les « très attendus » remerciements...

Depuis plusieurs années (et, je pense, comme tous les doctorants), j'ai été régulièrement confrontée à une question récurrente au sein de mon entourage. J'entends encore mes Mamy me demander : « *Mais, finalement, c'est quoi ton travail ?* » ou Papa, bien embêté, tenter de répondre à quelqu'un qui lui demande ce que fait sa « petite fille chérie »...

Bien que la lecture de l'entièreté de ce manuscrit puisse être un bon élément de réponse, je souhaite profiter de ces remerciements pour apporter ma propre vision de ce en quoi consiste la réalisation d'une thèse de doctorat.

Faire un doctorat,...

... c'est avant tout UNE rencontre, celle d'un jeune chercheur avec un promoteur de thèse.

Pour ma part, on peut dire que ce fut une très belle rencontre !

Patsy, ces quelques mots seront bien peu en comparaison de tout ce que tu as pu m'apporter durant ces années de doctorat, à tout le temps et l'attention que tu as consacrée à mon travail. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir offert un nouveau départ. Merci aussi pour ton suivi au quotidien dans les manips, tes conseils toujours pointus et judicieux, tes corrections à n'importe quelle heure, ta qualité de scientifique et de chef d'équipe et ton optimisme. Enfin, au-delà de ton rôle de promoteur, je tiens à te remercier pour tes qualités humaines, ta sensibilité envers les parcours de chacun de tes doctorants et ton don pour le « coaching » mental... Du fond du cœur, je te remercie d'avoir eu la patience de m'écouter, de me conseiller et de m'encourager lors de mes nombreuses périodes de doute. Grâce à toi, j'ai beaucoup appris, professionnellement parlant, mais aussi sur moi-même... et grâce à toi, j'y suis arrivée !

... c'est aussi être accueilli au sein d'un laboratoire de recherche

Et à la tête de notre laboratoire de recherche, il y a des seniors qui, passionnés par la recherche et dévoués pour l'URBC, se donnent tous les jours à fond, sans compter leurs heures, pour nous permettre de travailler dans les meilleures conditions possibles.

Merci à Martine Raes, José Remacle et Thierry Arnould qui, en tant que directrice/teurs successifs du labo, m'ont accueilli au sein de l'URBC depuis mon mémoire.

Merci à vous, Carine, Florence, Martine, Patsy, Olivier et Thierry. J'ai beaucoup de reconnaissance et d'admiration pour votre travail au quotidien pour le labo. Merci à vous tous pour vos conseils, vos petits mots d'encouragements, ... Merci d'avoir su trouver les mots pour me faire renoncer à l'abandon de cette thèse.

Au labo, il y a aussi une super « future ex secrétaire » ! Merci à toi Anne, pour ton travail efficace mais surtout pour ton soutien durant cette fin de thèse ! Je te souhaite de tout cœur le meilleur dans tes futures fonctions et avec Bernard, Camille et ... Arthélia !

Et enfin, il y a l'équipe des « services communs », ceux qui font tourner le labo au quotidien. Merci Guy, pour tes bisous ;) et courage pour l'épreuve à venir ! Merci Martine, Noëlle et Catherine, Maude, Edouard, Marc et Antoine, pour votre travail au service de tous, pour votre expérience, vos conseils !

... c'est s'intégrer au sein d'une équipe de recherche

La DYSO team en ce qui me concerne, dirigée de concert par Patsy et Thierry !

Une équipe de recherche, ça vit, ça évolue en fonction des arrivées et des départs de chacun... Difficile dès lors de remercier tous les chercheurs qui ont partagés la « bannière » DYSO avec moi durant ces années sans risquer d'en oublier ! Donc, d'avance, merci à tous, anciens et nouveaux DYSO pour le soutien et la bonne ambiance au sein de l'équipe. Je pense particulièrement à Aurélia et Silvia pour nos

pauses midi à la Maison des Desserts (d'ailleurs, il serait peut-être temps d'en replanifier une, depuis le temps...), à Kayleen et sa bonne idée d'avoir instauré des petites douceurs afin d'égailler nos réunions du vendredi après-midi (Kayleen, je sais à quel point être maman et doctorante n'est pas toujours simple mais c'est aussi une force alors fonce, tu y arriveras et Liloo sera super fière de toi!), à Guillaume VB, à Julien, à Guillaume R (2014 s'annonce inoubliable pour toi et Emilie, profitez-en bien!), à Seb et Anaïs (vous deux, je vous consacre un paragraphe plus bas ;)), à Stéphane et aux « petits nouveaux », Elodie, Bush et enfin Samuel. Longue vie à l'équipe DYSO !

... c'est apprendre de l'expérience des autres

Durant ces quelques années de recherche, j'ai eu la chance de croiser des personnes qui m'ont marquées, par leur expérience, leurs connaissances, leur savoir-faire, leur rigueur... Ces personnes ont contribué, chacune à leur manière, à faire de moi le chercheur que je suis maintenant et je leur en suis très reconnaissante. Andrée, j'espère que tu auras l'occasion lors d'un de tes passages en URBC, de lire ces quelques lignes ! Merci de m'avoir transmis quelques précieux trucs et astuces de bio mol, j'ai apprécié les moments que nous avons partagés. Merci Martine, toi qui a été la première à m'apprendre la culture cellulaire, la base ! J'aime ta spontanéité, tes « chers tous » vont me manquer ;). Merci Edouard, pour les nombreuses heures de TP partagées ! Alors que je termine cette thèse, tu t'apprêtes à entamer toi aussi une nouvelle vie. Je te la souhaite heureuse et bien remplie (mais ça, je n'en doute pas une seconde !). Et enfin, un énorme merci à Marc. Merci évidemment pour l'initiation à la spectrométrie de masse mais surtout pour l'intérêt que tu as toujours porté à mon travail, pour tes suggestions, tes idées qui ont permis au projet d'atteindre son objectif. Et puis, je suppose que je dois aussi te remercier pour l'attention toute particulière dont tu as fait preuve ces derniers temps envers mes diverses addictions capillaires et autres... ;)

... c'est confronter et partager ses connaissances à celles d'autres scientifiques

Je tiens particulièrement à remercier les Professeurs Praseuth, Pierreux, Muylkens, Raes et Debolle, membres de mon jury de thèse, pour l'attention et le temps consacrés à la lecture de ce document et pour les conseils et suggestions apportés lors de la défense privée dans le but d'améliorer ce manuscrit.

... c'est transmettre un peu de ce que l'on a appris

Lors d'un doctorat, on a souvent l'occasion d'encadrer un ou plusieurs jeunes mémorants dans leurs premiers pas au labo. Dans mon cas, ce furent de très belles expériences, enrichissantes autant pour eux (enfin, je l'espère...) que pour moi ! Merci spécialement à Anaïs et Sébastien pour le travail que vous avez réalisé, le sérieux que vous y avez mis, pour votre gentillesse,... et puis, pour ce samedi après-midi récemment consacré à m'aider dans le formatage pdf de ce manuscrit ! Mes anciens mémorants qui viennent à ma rescousse, la boucle est bouclée ! Sans vous, ... non, je préfère ne même pas imaginer ce qu'il se serait passé sans votre aide ;). Mais sachez que vous pourrez compter sur moi en cas de besoin lorsque ce sera votre tour. D'ici là, je vous souhaite une bonne poursuite/fin de thèse et beaucoup de bonheur dans vos futurs projets.

... ce sont de belles rencontres

Toutes ces personnes avec qui l'on partage le quotidien avec ses potins, ses joies, ses peines, ses doutes, ses coups de gueule, et quelques larmes parfois... que ce soit à la salle café ou dans le bureau... bref, bien plus que des simples collègues, ...

Alors en vrac, merci à Sofia (pour tous ces bons moments partagés), à Soumia et Christelle (pour le partage de nos expériences de « super-mamans »), à mes collègues de bureau : Florence, Valérie, Virginie, Mélanie, Maude et surtout à celles avec qui j'ai partagé ces derniers mois : Caroline, Hélène et Déborah ! Vous êtes géniales les filles, je vous adore et souhaite que l'on puisse rester en contact malgré nos changements de vie ! Sans oublier les nouveaux : Géraldine et Samuel (à qui je souhaite le meilleur pour

leurs débuts en URBC). Et puis, dans ce doctorat, il y aura eu « l'avant et l'après congrès à Aachen »... La « Lady Gaga » qui se cachait en moi a enfin pu s'exprimer ;) et pour cela je voulais particulièrement remercier Benoit, Lio, Hélène et leurs moitiés respectives et Deb'.

Merci à tous les URBCéens d'avoir tout simplement partagé un peu de cette aventure avec moi.

... ce sont des moments de doute

Ce n'est un secret pour personne, cette fin de doctorat fut un réel combat contre moi-même... Mais j'ai eu la chance extraordinaire d'être entourée et soutenue... Alors, c'est bien peu de choses mais tout simplement merci à tous ceux qui se reconnaîtront pour les petits passages dans mon bureau, les mails, les petits mots gentils, ... Merci aussi à Annick avec qui j'ai partagé le stress des dernières étapes. A nous l'après-thèse ! =)

... c'est aussi la vie tout simplement,

Parce que dans le doctorat, y a tout de même pas que le doctorat ! Et heureusement...

Merci à An, PE, Christelle, Nico, Céline, Cindy, Thomas, Elise, François, Laurence, Didier, Françoise, Henry et tous les p'tits loustics pour votre amitié, pour votre présence à nos côtés, pour les coups de fil, pour les petits soupers, les balades, les vacances au soleil, les lundis de kermesse, les dépannages « babysittings », les covoiturages extrascolaires, ...

Merci à ma famille pour son soutien sans faille.

Merci Maman et Papa d'avoir été là tout au long de ce parcours... du combattant ! Merci pour toute l'aide inestimable apportée durant cette thèse, notamment dans la gestion du quotidien (repas, mannes de repassage, garde enfant malade, garde doctorante stressée !,...) mais surtout merci d'avoir toujours cru en moi, même quand moi-même, je n'y croyais plus. Je vous dois beaucoup et vous aime énormément.

Merci à mes deux grand-mères. Je suis si contente que vous soyez présentes toutes les deux en ce grand jour de défense publique. Merci Mamy Renée pour les bougies et Mamy Claudine pour tes mails encourageants.

Merci les 3 frères pour votre audace, votre ambition et pour l'exemple que vous êtes. J'ai toujours eu beaucoup d'admiration pour vous... Merci surtout à toi, Parrain, pour ton soutien à distance et à Agnès de m'avoir ouvert les portes de son cabinet durant quelques semaines de rédaction.

Et enfin, je vais terminer par vous remercier, mes trois amours...

Merci à toi Benja d'avoir été à mes côtés durant toute cette épreuve, de m'avoir supportée avec mes angoisses, de m'avoir toujours soutenue, avec plus ou moins de patience, dans mes choix et mes changements de choix, de m'avoir emmenée prendre l'air quand plus rien n'allait, de m'avoir servi de guide lorsque j'étais perdue,... J'ai beaucoup de chance de t'avoir à mes côtés.

Merci à mes deux petits loups, Clément et Emma, pour vos beaux sourires, pour vos petits mots d'encouragements. Je vous promet de rattraper bien vite les week-ends manqués et ces parties de jeux reportées.

En définitive, le doctorat, oui, ce sont de longues heures de travail, une bonne dose d'organisation et de rigueur dans les manips, des piles d'articles lus (ou du moins imprimés ;)), un certain nombre de frustrations lorsque rien ne va comme on le souhaiterait,... mais ce sont aussi ces moments de pur bonheur face à un résultat positif, la fierté de pouvoir faire une recherche à son nom dans Pubmed, le plaisir de se rendre compte que notre travail puisse être reconnu par d'autres chercheurs et puis c'est avant tout une sacrée aventure humaine !

LISTE D'ABREVIATIONS

°C	degré Centigrade
1D	une dimension
3C	Chromatin Conformation Capture
ACH	Active Chromatin Hubs
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AP-1	Activated Protein-1
AP-MS	(protein complex) Affinity Purification followed by Mass Spectrometry
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARNnc	Acide RiboNucléique non codant
ARNPI , II ou III	ARN Polymérase de type 1, 2 ou 3
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomique
ARNt	Acide RiboNucléique de transfert
ATP	Adenosine TriPhosphate
b-HLH	basic Helix-Loop-Helix
BRE	TFIIB Recognition Element
BSA	Bovine Serum Albumin
bZIP	basic Leucin Zipper
C18	gel de silice sur lequel sont greffés des groupes à 18 atomes de carbone
CBP	CREB-Binding Protein
CD4	Cluster of differentiation 4
CHCA	α -Cyano-4-HydroxyCinnamic Acid
CHD	Chromodomain/Helicase DNA binding protein
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation
CPSF	Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor
CRAPome	Contaminant Repository for Affinity Purification–mass spectrometry data
CREB	cAMP-Responsive Element-Binding protein
CRM	Cis-Regulatory Module
CSS	Core Similitary Score
CstF	Cleavage Stimulatory Factor
CTCF	CCCTC-Binding Factor
CTD	C-Terminal Domain
DBD	DNA-Binding Domain
DCE	Downstream Core Element
DHB	2,5-DiHydroBenzoic acid
DNAss	salm sperm DNA
DPE	Downstream Promoter Element
DSIF	DRB-Sensitivity Inducing Factor
DTT	Dithiothreitol
eARN	ARN associés à des enhanceurs
EB	Enhancer Blocking
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
EEC	Early Elongation Complex
eIF	eukaryotic Initiation Factor

ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
ELL	Eleven-nineteen Lysine-rich in Leukemia
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ER α	Estrogen Receptor Alpha
ERK-2	Extracellular signal-Regulated Kinase 2
ESI	ElectroSpray Ionisation
ETS 1	E-Twenty Six protein 1
FCP1	TFIIF-associating CTD Phosphatase 1
FLO11	Flocculin-11
FPR	False Positive Rate
FT	Facteur de transcription
GTF	Facteurs de Transcription Généraux
HAT	Histone Acetyltransferase
HB	Hypotonic Buffer
HDAC	Histone Deacetylase
HFD	Histone-Fold Domain
HLH	Helix-Loop-Helix
HMM	Hidden Markov Model
hnRNP	heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horse Radish Peroxidase
HTH	Helix-Turn-Helix
ICAT	Isotope-Coded Affinity Tag
Id	Inhibitor of DNA binding
IFN	Interferon
I κ B	Inhibitor of NF κ B
IKK	I κ B kinase
IL-1 β	Interleukin 1 beta
INO80	INOsitol-requiring 80
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IRF4	Interferon Regulatory Factor
ISWI	Imitation SWItch
ITC	Initially Transcribing Complex
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kb	kilobase
Kd	Constante de dissociation
KH	K Homologous domain
LC	Liquid Chromatography
LCR	Locus Control Region
LEF-1	Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1
LM-PCR	Ligation-Mediated PCR
LNA	Locked Nucleic Acid
lncARN	longs ARN non codants
LPS	Lipopolysaccharide
LSF	Late SV40 Factor
LTR	Long Terminal Repeat

MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAR	Matrix Attachment Region
MBD	Methyl-CpG Binding Domain
MBP	Methyl-CpG Binding Protein
MDC	Macrophage-Derived Chemokine
Mdm2	Murine double minute 2
MDR	Methylation Determining Region
Meis-1	Myeloid ecotropic viral integration site 1
miARN	microARN
MRF	Myogenic Regulatory Factor
mRNP	mRNA-binding protein
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	tandem Mass Spectrometry
MSS	Matrix Similitary Score
MTA2	MeTastasis Associated 1 family, member 2
MudPIT	Multidimensional Protein Identification Technology
MyoD	Myoblast Determining gene
N-Cor	Nuclear receptor Co-Repressor
NELF	Negative Elongation Factor
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NFκB	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLS	Nuclear Localisation Site
NR	Nuclear Receptor
nt	nucleotide
nuc	nucleosome
Oligo	Oligonucléotide
paARN	ARN associés à un promoteur
PAF	Polymerase-Associated Factor
PARP-1	Poly-ADP Ribose Polymerase-1
pb	paire de bases
PBM	Protein-Binding Microarray
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBX	Pre-B-cell leukemia transcription factor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFM	Position Frequency Matrix
piARN	ARN interagissant avec Piwi
PIC	Pre-Initiation complex
PIC _h	Proteomics of Isolated Chromatin segments
PMA	Phorbol 12-Myristate-13-Acetate
Pr-pp	Promoter Proximal Pausing
PSSM	Position-Specific Scoring Matrix
P-TEFb	Positive Transcription Elongation Factor b
PVA	PolyVinyl Acetate
PWM	Position Weight Matrix
qTOF	quadrupole - Time Of Flight

Rbp	RNA B Polymerase subunit
RBBP	RetinoBlastoma Binding Protein
RBP	RNA Binding Protein
REST	RE1 Silencing Transcription factor
RHD	Rel-Homology Domain
rNTP	riboNucleoside TriPhosphate
RP	Reverse-Phase
RPS3	Ribosomal Protein S3
SAGA	Spt-Ada-Gen5-Acetyltransferase
SCX	Strong Cation Exchange
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
siARN	petits ARN interférents
SILAC	Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture
SMRT	Silencing Mediator for Retinoic or Thyroid-hormone receptors
SNAP	SILAC Nucleosome Affinity Purification
snRNA	Small Nucleolar RNA
SREBP	Sterol Regulatory Element-Binding Protein
SRM	Selected Reaction Monitoring
STAT 1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
STR	Short Tandem Repeat
SWI/SNF	Switching-Defective/SucroseNon-Fermenting
TAD	<i>Trans</i> -Activation Domain
TAF	TBP-Associated Factor
TBP	TATA-Binding Protein
TD50	solution de Na ₂ HCO ₃ 50 mM
TetR	Tetracyclin Repressor
TF	Transcription Factor
TFA	Trifluoroacetic Acid
TFBS	Transcription Factor Binding Site
TFII-X ...	general Transcription Factor II-X...
TOF	Time Of Flight
TRF	TBP-Related Factor
TSS	Transcription Start Site
U	Unité enzymatique
UTR	UnTranslated Region
UV	UltraViolet
VIH-1	Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1
Wnt	Wingless/Integration
WRE	Wnt-Responsive Element
YB1	Nuclease-sensitive element-binding protein 1
YY1	Ying Yang 1

TABLE DES MATIERES

RESUME:	I
ABSTRACT.....	II
REMERCIEMENTS	IV
LISTE D'ABREVIATIONS	VII
TABLE DES MATIERES	XI

INTRODUCTION

Avant-Propos	1
I. La régulation de l'expression génique	3
II. La régulation transcriptionnelle des gènes de classe II chez les eucaryotes.....	4
<i>II.1 La machinerie basale de transcription</i>	5
<i>II.2 Le déroulement du processus de transcription</i>	7
<i>II.3 Les éléments cis-régulateurs</i>	10
II.3.1 Le promoteur basal et ses motifs spécifiques	11
II.3.2 Le promoteur proximal	13
II.3.2.1 Liaisons chimiques impliquées dans la liaison TF-TFBS	13
II.3.2.2 Recherche de la séquence consensus d'un facteur de transcription.....	14
II.3.2.3 Limites des séquences consensus modélisées.....	14
II.3.3 Les éléments de contrôle distaux.....	15
II.3.3.1 Les enhancers et silencers.....	16
II.3.3.2 Les insulateurs	17
II.3.3.3 Les régions de contrôle du locus (LCR pour locus control region).....	17
<i>II.4 Les éléments trans-régulateurs</i>	18
II.4.1 La machinerie basale et ses variantes	18
II.4.2 Les facteurs de transcription spécifiques et les corégulateurs transcriptionnels	19
II.4.2.1 Facteurs de transcription : structure et classifications	19
II.4.2.2 Comment les FT modulent-ils la transcription ?	20
a) Recrutement direct de la machinerie de transcription.....	20

b) Recrutement indirect de la machinerie de transcription, par le biais de corégulateurs	20
c) Recrutement d'autres FT, suivant le principe de coopération	20
d) Influence d'un FT sur la courbure de l'ADN	21
e) Modification du paysage épigénétique	21
f) Modes d'action passifs	21
g) Modulation d'autres étapes que l'initiation transcriptionnelle	21
II.4.2.3 Les corégulateurs transcriptionnels	21
II.4.2.4 Régulation spécifique du contrôle transcriptionnel	23
a) Régulation directement liée à la séquence promotrice	23
b) Régulation liée à l'abondance nucléaire du FT	26
c) Régulation dépendante d'interactions protéiques	27
d) Régulation liée aux capacités transactivatrices des FT.....	28
<i>II.5 Les éléments de régulation épigénétiques</i>	<i>28</i>
II.5.1 La méthylation de l'ADN	29
II.5.2 Composition, structure et positionnement des nucléosomes	30
II.5.2.1 Organisation de la chromatine : les acteurs	30
II.5.2.2 Les modifications post-traductionnelles des histones influencent l'activation transcriptionnelle	31
II.5.2.3 Les marques épigénétiques influencent les interactions ADN/protéines.....	31
II.5.2.4 Dialogue bidirectionnel entre nucléosomes et facteurs de transcription	32
II.5.2.5 Les marques épigénétiques influencent l'organisation de la chromatine au sein du noyau	33
<i>II.6 Les ARN non codants.....</i>	<i>33</i>
III. Etudier les interactions ADN/protéines	34
<i>III.1 Avec quelle(s) séquence(s) d'ADN interagit une protéine d'intérêt?</i>	<i>34</i>
III.1.1 L'empreinte à la DNase et ses variantes:	35
III.1.2 L'immunoprécipitation chromatinienne et ses variantes	35
<i>III.2 Quelles protéines interagissent avec une séquence d'ADN d'intérêt ?</i>	<i>36</i>
III.2.1 Les approches <i>in silico</i>	36

III.2.2.1 D'où proviennent les faux-positifs générés par les analyses <i>in silico</i> ?	37
a) Différences entre liaison ADN-TF in vitro et in vivo	38
b) Influence du contexte génomique et protéique	38
III.2.2.2 D'où proviennent les faux-négatifs générés par les analyses <i>in silico</i> ?	39
III.2.2 Le retard sur gel et les méthodes dérivées:	39
III.2.3 Les stratégies basées sur le principe de chromatographie d'affinité à l'ADN (<i>DNA-affinity</i>).....	40
OBJECTIF	52
RESULTATS	53
I. Développement de la démarche expérimentale :	53
I.1 Choix d'un modèle expérimental pour tester la faisabilité de la méthode :	55
I.2 Choix et efficacité d'un système de fixation dissociable du support solide :	57
I.2.1 Préparation de la sonde oligonucléotidique	57
I.2.2 Choix du support solide et fixation	58
I.2.3 Choix du mode d'élution spécifique	59
I.2.3.1 Elution spécifique d'un oligonucléotide portant une biotine photoclivable	59
I.2.3.2 Elution spécifique à l'aide d'une restriction enzymatique	60
I.2.3.3 Elution spécifique suite au déplacement compétitif d'un oligonucléotide desthiobiotinylé par un excès de biotine libre	61
I.3 Qualité et spécificité de la capture des protéines :	63
I.3.1 Détermination des conditions optimales de liaison des protéines sur l'ADN	63
I.3.1.1 Accessibilité des sites de liaison	64
I.3.1.2 Conditions physico-chimiques propices à la liaison spécifique de NFκB sur son site de liaison	65
I.3.2 Préparation des extraits protéiques nucléaires	66
I.4 Identification par spectrométrie de masse des protéines capturées	67
I.4.1 Adaptation du processus de digestion à un mélange protéique complexe	68
I.4.2 Optimisation du protocole liée à la présence de biotine libre	71

I.4.3 Décomplexification de l'échantillon peptidique avant l'analyse MS	72
I.4.3.1 Décomplexification par séparation électrophorétique	72
I.4.3.2 Décomplexification par chromatographie échangeuse d'ions	73
I.4.3.3 Décomplexification par une longue chromatographie en phase inverse.....	74
I.4.4 Adaptation de l'analyse MS à l'identification de protéines au départ d'un mélange peptidique complexe	76
I.4.5 Adaptation de la procédure de validation des protéines au départ d'un mélange peptidique complexe	77
II. Validation et application de la démarche expérimentale.....	78
DISCUSSION, CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	95
I. Commentaires sur les résultats biologiques obtenus	95
II. Apports de la méthode développée	97
<i>II.1 Une méthode efficace caractérisée par une combinaison inédite de stratégies.....</i>	<i>97</i>
II.1.1 Utilisation de la desthiobiotine comme moyen d'élution spécifique	97
II.1.2 Décomplexification de l'échantillon	99
II.1.3 Utilisation d'une liste d'exclusion de peptides à partir d'une SPL (scheduled precursor ion list).	99
<i>II.2 Un point de départ pour une étude de la régulation transcriptionnelle d'un gène.....</i>	<i>101</i>
II.2.1 Combiner expériences de « DNA-affinity » et analyses <i>in silico</i> pour sélectionner des candidats à valider.....	101
II.2.2 Identification de protéines non proposées par les analyses <i>in silico</i>	102
<i>II.3 Une méthode offrant un moyen d'accès aux interactions indirectes et à l'élucidation de complexes protéiques liés à l'ADN</i>	<i>103</i>
III. Limites de la méthode développée.....	104
<i>III.1 Limitations techniques.....</i>	<i>104</i>
III.1.1 Eléments à l'origine de faux négatifs	104
III.1.2 Eléments à l'origine de faux positifs	107
III.1.3 Comment savoir si une protéine identifiée est un faux positif ou non ?	108

<i>III.2 Limites biologiques de la méthode développée</i>	<i>109</i>
III.2.1 La liaison d'un FT à un site ne garantit pas sa fonctionnalité.....	109
III.2.2. Il s'agit d'une méthode d'identification d'interaction ADN/protéines <i>in vitro</i> .	110
IV. Perspectives de la méthode développée.....	111
<i>IV.1 Perspectives d'analyses basées sur la reconstitution in vitro des complexes</i>	
<i>ADN/protéines</i>	<i>111</i>
<i>IV.2 Perspective visant à analyser les complexes ADN/protéines formés in vivo</i>	<i>112</i>

